

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

ZUR SPEZIFITÄT DER MENSCHLICHEN SERUM-PARAOXONASE

Vergleichende Untersuchungen mit den Substraten
Paraoxon, Phenylacetat und β -Naphthylacetat

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Franz Jürgen Großhauser
aus Neumarkt

1976 № 4 13



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546220_0093

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

ZUR SPEZIFITÄT DER MENSCHLICHEN SERUM-PARAOXONASE

Vergleichende Untersuchungen mit den Substraten
Paraoxon, Phenylacetat und β -Naphthylacetat

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Franz Jürgen Großhauser
aus Neumarkt

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer

Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher von Mallinckrodt

Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Oktober 1976

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung.....	4
II. Problemstellung.....	8
III. Experimentelle Untersuchungen	
1. Untersuchungen zur Trennung der Paraoxonase und der Arylesterasen des menschlichen Serums durch die Stärkegelelektrophorese	
A. Material und Methodik.....	9
a) Zubereitung des Gels.....	9
b) Apparative Anordnung.....	10
c) Einbringen der Serumproben in das Gel.....	11
d) Schneiden und Färben der Gelstreifen	11
B. Charakterisierung der Orte der Paraoxonase- und der Arylesteraseaktivitäten.....	11
a) Ort der Paraoxonaseaktivität.....	11
b) Ort der Arylesteraseaktivität.....	12
C. Versuchsergebnisse.....	13
a) Gegenüberstellung der Hydrolyse von Phenylacetat, β -Naphthylacetat und E 600 im Stärkegel durch menschliches Serum.....	13
b) Vergleich der Orte der Arylesterasen im Stärkegel, die Phenylacetat bzw. β -Naphthylacetat spalten.....	15

c) Gegenüberstellung der Orte der drei Paraoxonaseaktivitäten im Stärkegel	17
2. Untersuchungen der möglichen Korrelation zwischen der Paraoxonaseaktivität und der Arylesteraseaktivität im menschlichen Se- rum	
A. Methodik zur Messung der Serum-Para- oxonaseaktivität und zur Bestimmung der Zugehörigkeit zu einer der drei Enzymgruppen im menschlichen Serum, welche Paraoxon (E 600) hydrolytisch spalten	21
a) Angewandtes Meßverfahren	21
b) Lösungen	21
c) Ansatz	22
d) Messung	22
e) Berechnung	22
B. Methodik zur Messung der Serum-Aryl- esteraseaktivität mit β -Naphthylace- tat als Substrat	
a) Angewandtes Meßverfahren	22
b) Lösungen	23
c) Ansatz	23
d) Messung	23
e) Berechnung	23
C. Versuchsergebnisse	24
3. Untersuchungen zur Bestimmung des Ein- flusses von DFP (Diisopropylfluorophos- phat) auf die Arylesteraseaktivität ei-	

nerseits, und die Aktivität der menschlichen Paraoxonase andererseits	
A. Methodik zur Messung des Einflusses von DFP auf die Arylesterase- und die Paraoxonaseaktivität	
a) Angewandtes Meßverfahren	27
b) Durchführung der Hemmversuche ...	27
B. Versuchsergebnisse	28
IV. Diskussion und Zusammenfassung	32
V. Literaturverzeichnis	35

I Einleitung

Frühere Arbeiten von Augustinsson (1954,1959) zeigten, daß drei Esterase-Typen im Plasma von Wirbeltieren vorkommen. Er teilte sie hinsichtlich ihrer Substratspezifität und Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren in Arylesterasen oder A-Esterasen (heute EC 3.1.1.2), Aliesterasen (Carboxylesterasen) (heute EC 3.1.1.1) und Cholinesterasen (heute EC 3.1.1.8) ein.

Die Arylesterasen werden im Serum der Säugetiere gefunden, hingegen nicht bei anderen Wirbeltieren (Augustinsson 1959). Sie spalten die Ester aromatischer Alkohole (Phenole, Naphthole), deren Acetate werden in der Regel schneller gespalten als die Butyrate. Auch Organophosphorverbindungen ((Diisopropylfluorophosphat (DFP), Dimethylamido-äthoxyphosphoryl-cyanid (Tabun) und Tetraäthylpyrophosphat (TEPP)) sollen zumindest teilweise durch die Arylesterasen gespalten werden (Mounter 1954, Augustinsson und Heimbürger 1954,1954).

Aldridge (1953 a) untersuchte Esterasen bei verschiedenen Spezies, auch beim Menschen. Er fand zwei Typen von Esterasen, die er nach ihrer Hemmbarkeit durch E 600 ((O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)phosphat)) in A- und B-Esterasen einteilte. Die A-Esterasen werden durch E 600 nicht gehemmt, die B-Esterasen dagegen werden durch E 600 in einer Konzentration von 10^{-7} bis $10^{-8}M$ gehemmt.

Aus weiteren Untersuchungen an Pferd, Kaninchen und Ratte schloß Aldridge (1953 b) auf die Identität

des von ihm als A-Esterase gekennzeichneten Enzyms mit der E 600-spaltenden Esterase. Die Identität leitete Aldridge (1953 b) aus folgenden Ergebnissen ab:

- A-Esterasen und E 600-Esterase sind gegenüber den gleichen Hemmstoffen empfindlich.
- Keines der beiden Enzyme wird durch Eserin gehemmt.
- Die Hemmung der enzymatischen Hydrolyse von p-Nitrophenylacetat und E 600 ist prozentual gleich, wenn als hemmende Substanz Diäthylphosphat eingesetzt wird.
- Das Aktivitätsverhältnis für beide Substrate ist bei den Seren einer Tierart immer konstant.

Weitere Untersuchungen waren auf die Frage gerichtet, ob die von Aldridge (1953 a) entdeckte A-Esterase-Aktivität wirklich identisch ist mit der hinsichtlich ihrer Substratspezifität recht großzügig gefaßten Arylesterase.

Geldmacher -v. Mallinckrodt und Mitarbeiter (1972) halten den beim Menschen für die Paraoxonase gefundenen, wahrscheinlich genetisch bedingten Polymorphismus für ein neues, sehr geeignetes Kriterium, um die Spezifität des Paraoxon-spaltenden Enzyms im menschlichen Serum zu zeigen. (Der Name Paraoxonase steht im "Enzyme Nomenclature" (1972) als nicht empfohlene Bezeichnung für das Enzym EC 3.1.1.2, Arylesterase.) Dieser Polymorphismus konnte bei der Arylesterase nicht nachgewiesen werden (Simpson 1971).

Auf diese typische Eigenschaft der E 600-spalten-

den Aktivität im menschlichen Serum wies Krisch (1968) erstmals hin. Krisch (1968) und später auch Zürcher (1971), sowie Zech und Zürcher (1974) konnten für die menschliche Serum-Paraoxonase eine Bimodalität in der Verteilung der Enzymaktivitäten feststellen.

Geldmacher -v.Mallinckrodt und Mitarbeiter (1973) konnten nachweisen, daß sogar drei Gruppen von Normalpersonen mit verschieden stark ausgeprägter Aktivität des E 600-spaltenden Enzyms abzugrenzen sind, nämlich solche mit niedriger ($97,1 \pm 36,3$ U/l), mittlerer ($262 \pm 41,4$ U/l) und hoher ($449,6 \pm 79,4$ U/l) Aktivität.

Auch konnten Geldmacher -v.Mallinckrodt und Mitarbeiter (1973) zeigen, daß die menschliche Serum-Paraoxonase ein sehr spezifisches Enzym ist, das schon auf geringfügige Veränderungen am Substratmolekül reagiert. So spaltet die menschliche Serum-Paraoxonase zwar Methyl-Paraoxon und auch PO-Chlorthion, nicht jedoch die entsprechenden Thionophosphate Parathion, Methyl-Parathion und Chlorthion, Paraoxon-Derivate mit der Nitrogruppe in o- oder m-Position, sowie die einfach und doppelt desalkylierten Paraoxonderivate.

Ferner hat die Arylesterhydrolase ein pH-Optimum von 7,9 bzw. 8,5 (Simpson 1971), Paraoxonase entfaltet ihre maximale Enzymaktivität erst bei einem pH von 11,0 bis 11,6 (Krisch 1968).

Pilz (1968) konnte durch Stärkebrei-Elektrophorese aus menschlichem Serum 12 Enzyme auftrennen, die aromatische Ester hydrolysierten und von denen 10

den Arylesterasen zuzuordnen waren. Keine der isolierten Arylesterasen konnte organische Phosphorsäureester spalten.

11 Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob sich durch das einfache Verfahren der Stärkegel-Elektrophorese die beiden Aktivitäten zur Spaltung des Phosphorsäuretriesters Paraoxon und der einfachen Arylester Phenylacetat und β -Naphthylacetat trennen lassen. Auch sollte erforscht werden, ob eine Korrelation zwischen der Paraoxonase-Aktivität und der Arylesterase-Aktivität im menschlichen Serum besteht, wie dies von Aldridge (1953) für Seren einer Tierart postuliert wurde.

III Experimentelle Untersuchungen

1. Untersuchungen zur Trennung der Paraoxonase und der Arylesterasen des menschlichen Serums durch die Stärkegelelektrophorese

A. Material und Methodik

Als biologisches Material diente das nicht mehr als 24 Stunden alte Serum von gesunden Blutspendern der Universität Erlangen. Auch wurde das Serum von Sportlerinnen der Hochschule für Leibeserziehung in Erlangen untersucht, die nach der Anamnese ohne chronisches Leiden und ohne ernstere Erkrankung im letzten Jahr waren.

Die elektrophoretische Auftrennung der menschlichen Seren durch die horizontale Stärkegelelektrophorese erfolgte nach Baitsch und Liebrich (1961). Die Serumproteine werden im Stärkegel einmal nach der Ladung der Moleküle getrennt. Das Stärkegel hat darüber hinaus einen ausgeprägten Siebeffekt (Ultrafiltrationseffekt), der die Proteinmoleküle nach Größe (und Form?) trennt.

a) Zubereitung des Gels

Die gebrauchsfertig hydrolysierte Stärke der Fa. E. Merck, Darmstadt, wurde in dem Gelpuffer aufgeschwemmt. Anschließend wurde diese Aufschwemmung unter dauerndem Schütteln 5 Minuten gekocht.

Puffer zum Aufschwemmen und Kochen der Stärke:

Stammlösung: 1,86g Borsäure krist. (p.a.)
1,50g NaOH-Plätzchen (rein)
ad 2000 ml aqua dest., pH 10,8.
Zum Gebrauch werden 170 ml
dieser Stammlösung mit 130 ml
aqua dest. verdünnt.

Die Aufschwemmung wurde zunächst fest, bei weiterem Kochen wurde sie dann wieder dünnflüssig-glasig. Diese mäßig viskös-glasige Masse wurde dann in einem flachen, etwa 1cm hohen Trog aus PVC ausgegossen. Die Tröge wurden sofort nach dem Ausgießen abgedeckt, und das Gel war nach 2 Stunden gebrauchsfertig.

b) Apparative Anordnung

An zwei gegenüberliegenden Seiten des PVC-Troges standen Kammern aus PVC, die als Behälter für die Trennpuffer dienten. Die Verbindung zu den äußeren Kammern wurde mit 5 Lagen Filterpapier hergestellt. Ein Stromversorgungsgerät lieferte eine Klemmspannung von 190V. Der Spannungsabfall im Gel betrug 5 Volt/cm. Das Gel erwärmte sich bei diesem Stromdurchgang auf 28° C. Die Laufzeit betrug bei dieser Anordnung 4 Stunden.

Puffer zum Trennen des Serums:

18,55g Borsäure krist. (p.a.)
2,63g NaOH-Plätzchen (rein)
ad 2000 ml aqua dest., pH 8,6.

c) Einbringen der Serumproben in das Gel

Filterkartonplättchen wurden mit dem menschlichen Serum getränkt, die dann mit einer Pinzette in einen Transversalschlitz im Gel eingebracht wurden. Der Schlitz wurde mit einem Metallspatel vorgestoichen. Bei der Elektrophorese gab der Filterkarton das Serum schnell wieder ab.

d) Schneiden und Färben der Gelstreifen

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gelstreifen horizontal in der Mitte geschnitten. Das Schneiden der Gelstreifen erfolgte mit einem dünnen Draht. Die obere Stärkegelhälfte wurde abgehoben und die beiden Schnittflächen mit den entsprechenden Reagenzien gefärbt.

B. Charakterisierung der Orte der Paraoxonase- und der Arylesteraseaktivitäten

a) Ort der Paraoxonaseaktivität

Die obere Stärkegelhälfte mit den elektrophoretisch getrennten Seren wurde für 20 Minuten mit einer 1:5 verdünnten E 600-Stammlösung in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37° C inkubiert.

E 600-Stammlösung: $1,2 \times 10^{-2} \text{ M}$ E 600 in 0,1M Trispuffer, pH 8,0.

Diese Stammlösung wird zum Gebrauch jeweils 1:5 mit dest. Wasser verdünnt.

Durch enzymatische Hydrolyse wurde das E 600 in Diäthylphosphorsäure und p-Nitrophenol gespalten. Diese Freisetzung von p-Nitrophenol führte zu einer Gelbfärbung im Gel, welche den Ort der Paraoxonaseaktivität anzeigte.

b) Ort der Arylesteraseaktivität

Zur Durchführung der enzymatischen Hydrolyse von Phenylacetat bzw. β -Naphthylacetat wurde die untere Stärkegelhälfte nach erfolgter Elektrophorese ebenfalls 20 Minuten in einem Brutschrank mit der Phenylacetat- bzw. β -Naphthylacetatsubstratlösung inkubiert.

Phenylacetat- bzw. β -Naphthylacetatsubstratlösung: 4 ml einer äthanolischen Phenylacetat- bzw. β -Naphthylacetatstamm-lösung mit 125 mg Phenylacetat bzw. β -Naphthylacetat in 100 ml absolutem Äthanol werden mit 16 ml einer frisch bereiteten wässrigen Diazoniumsalzlösung (ca. 20 mg "Echtblausalz B" in 16 ml dest. Wasser) vermischt. (Ackermann 1968)

Während der Inkubationszeit färbten sich auf den Stärkeplatten die Stellen der enzymatischen Substratspaltung und der anschließenden Kupplung des dabei entstandenen Phenols bzw. β -Naphthols mit dem Diazoniumsalz rosa bis rot.

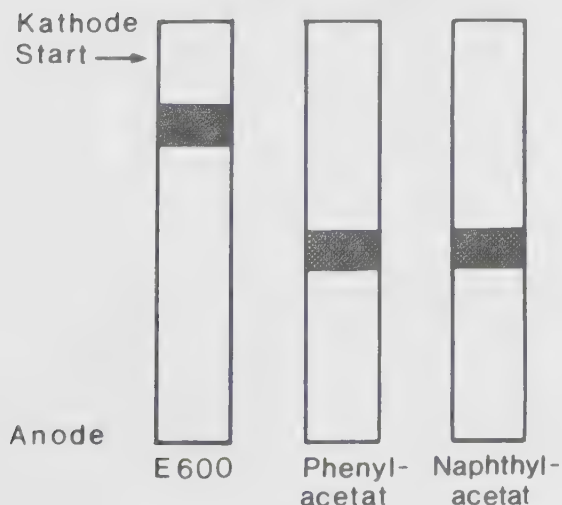
C. Versuchsergebnisse

- a) Gegenüberstellung der Hydrolyse von Phenylacetat, β -Naphthylacetat und E 600 im Stärkegel durch menschliches Serum

Blutseren von 67 Personen (Tab. 1) wurden durch die Stärkegelelektrophorese getrennt. Hierbei wurde jedes Serum auf seine Spaltfähigkeit gegenüber Phenylacetat, β -Naphthylacetat und E 600 untersucht.

Abb. 1

Gegenüberstellung der Hydrolyse von Phenylacetat, β -Naphthylacetat und E 600 durch menschliches Serum nach elektrophoretischer Auftrennung

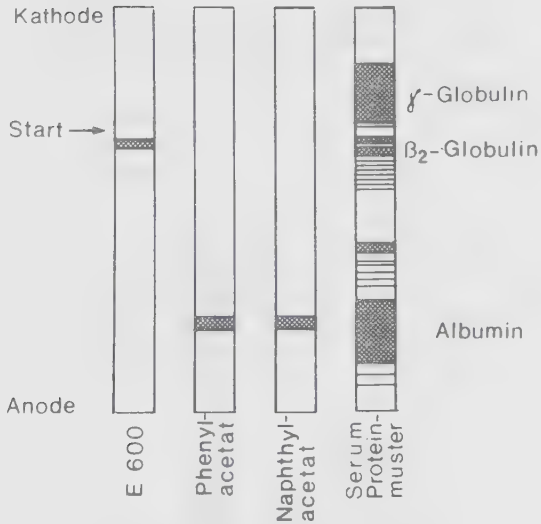


Nach Inkubation der getrennten Seren mit den Substratlösungen Phenylacetat, β -Naphthylacetat und E 600 zeigten sich auf dem Stärkegel die Maxima der Enzymaktivität durch orange Bänder bei der Phenylacetat- und β -Naphthylacetatsubstratlösung, bzw. durch gelbe Bänder bei der verdünnten E 600-Stammlösung (Abb. 1).

Die Orte der Phenylacetat- bzw. β -Naphthylacetat-Spaltung sowie der E 600-Hydrolyse wurden durch einen Vergleich nach Anfärbung der Serum-Proteinmuster der jeweiligen menschlichen Seren nach der Methode von Smithies (1959) mit Amidoschwarz festgelegt. Das Maximum der Phenylacetat- bzw. der β -Naphthylacetat-Spaltung lag im Bereich des Albumins, während das Maximum der enzymatischen E 600-Hydrolyse im Bereich des β_2 -Globulins lag (Abb. 2).

Abb. 2

Die Lage der Phenylacetat-,
 β -Naphthylacetat- und E 600-
spaltenden Enzymaktivitäten
im Vergleich zur Lage der
Serumproteine



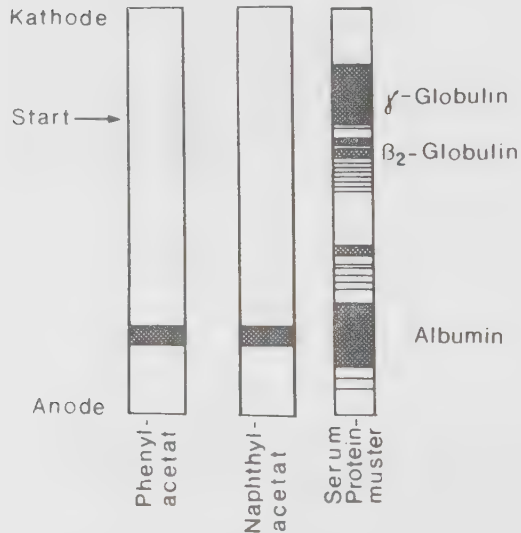
b) Vergleich der Orte der Arylesterasen im
Stärkegel, die Phenylacetat bzw. β -Naph-
thylacetat spalten

Beim Vergleich der Phenylacetat- und der
 β -Naphthylacetathydrolyse fiel auf, daß

sich Phenylacetat am Anfang stärker anfärbte als β -Naphthylacetat, was auf eine schnellere Spaltung dieses Substrates zurückgeführt werden könnte. Die Lage der Substratspaltung und damit der Ort der Enzymaktivität im Stärkegel war in beiden Fällen gleich (Abb. 3).

Abb. 3

Die Lage der Phenylacetat- bzw. β -Naphthylacetat-spaltenden Arylesterase im Vergleich zum Proteinmuster

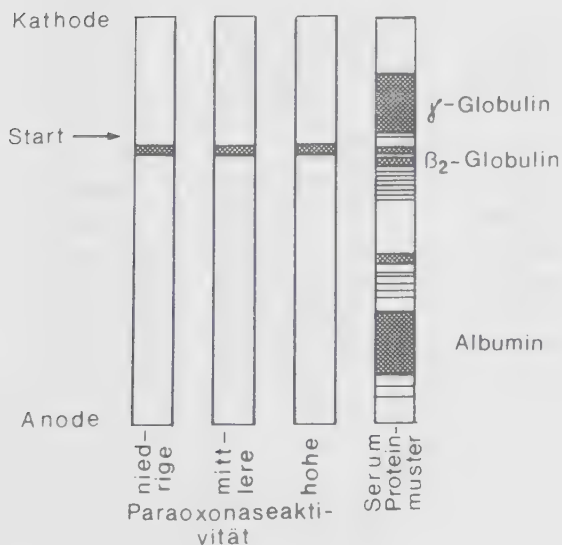


c) Gegenüberstellung der Lage der drei Paraoxonaseaktivitäten im Stärkegel

Ferner war die Beantwortung der Frage interessant, ob die nach Krisch (1968) photometrisch unterscheidbaren E 600-spaltenden Aktivitäten mit niedriger, mittlerer und hoher Enzymaktivität (Geldmacher -v. Mallinckrodt und Mitarbeiter 1973) nach elektrophoretischer Auftrennung eine unterschiedliche Lage im Stärkegel einnehmen. Hierzu untersuchten wir nach der oben beschriebenen Methode insgesamt 67 Seren mit niedriger (36), mittlerer (16) und hoher (15) Aktivität (Abb. 4).

Abb. 4

Die Lage der drei Paraoxonaseaktivitäten des menschlichen Serums im Vergleich zum Proteinmuster



Nach elektrophoretischer Trennung der Seren durch die Stärkegelelektrophorese wurden auf der einen Hälfte des Stärkegels die Orte der Paraoxonaseaktivitäten festgelegt. Auf der anderen Gelhälfte wurden die Proteine nach der Methode von Smithies (1959) angefärbt.

Es zeigte sich, daß die drei Paraoxonasetypen auf dem Stärkegelstreifen den gleichen Ort einnahmen.

Tabelle 1

Paraoxonaseaktivität der
elektrophoretisch getrenn-
ten 67 Blutseren

36 Personen		Niedriger Typ	
Name	Vorname	Alter (J)	Paraoxonase- aktivität (U/l)
Tunger	Gabriele	27	61,19
Pfeifenberger	Hannel.	39	61,19
Zwierz	Hans	36	63,79
Reinhardt	Brigitte	25	63,79
Volkmar	Christoph	31	63,85
Selvi	Fatima	26	65,78
Knuppel	Fred	29	66,45
Heinzel	Helmut	37	66,98
Schilling	Emmi	77	67,38
Becker	Peter	37	76,28
Baerwald	Viktor	28	85,05
Will	Gunther	38	91,70
Lehmann	Harry	26	95,68

Tabelle 1 Fortsetzung

Nette	Loni	38	95,68
Klement	Erwin	33	95,68
Müller	Wolfg.	28	96,21
Hengstler	Helga	25	97,01
Krummholz	Horst	38	102,33
Hornung	Johann	33	103,26
Kugler	Albrecht	46	103,66
Hulek	Friedm.	28	106,32
Bähr	Hannel.	33	111,23
Vogel	Rainer	27	111,23
Schwab	Hans	39	111,63
Hummel	Peter	42	116,95
Übelacker	Heinz	25	119,23
Ruge	Karl-H.	37	121,47
Pitzmann	Richard	32	123,59
Thaler	Helmut	25	126,25
Kraus	Jürgen	37	129,68
Paulini	Werner	35	129,68
Lulus	Bernd	37	131,17
Kraus Dr.	Werner	72	132,96
Leipold	Georg	25	132,96
Maier	Günther	37	133,24
Seitz	Helmut	39	133,36

16 Personen

Mittlerer Typ

Großmann	Hans	54	194,56
Pauscher	Karl-H.	35	228,58
Kinnigkeit	Eva	47	228,58
Waltemate	Wolfram	31	230,84
Tridel	Werner	30	231,26
Arlt	Volker	32	232,57

Tabelle 1 Fortsetzung

Dummler	Rainer	37	236,56
Hütte	John	27	238,42
Schwenk	Theodor	25	242,86
Rose	Wolfg.	28	243,20
Waurig	Siegmar	33	249,71
Floerke	Edith	56	251,18
Kran	Karl	36	251,18
Prietz	Peter	36	253,44
Konrad	Helmut	37	275,10
Bünning	Hans	31	301,96

15 Personen

Hoher Typ

Neudecker	Johann	47	372,19
Kreuz	Anita	34	375,61
Baugert	Rudolf	36	382,57
Opitz	Ulrike	21	386,20
Bauer	Hans	37	389,39
Marischler	Paul	45	390,61
Pilz	Konrad	40	392,05
Ranther	Gerhard	40	401,35
Gottschild	Roman	34	415,57
Lang	Kurt	28	423,95
Ziegler	Stefan	41	457,34
Braun	Peter	28	462,49
Wehner	Gerlinde	36	508,34
Vogler	Norbert	33	512,20
Gobel	Erhard	40	516,35

2. Untersuchungen der möglichen Korrelation zwischen der Paraoxonaseaktivität und der Arylesteraseaktivität im menschlichen Serum

A. Methodik zur Messung der Serum-Paraoxonaseaktivität und zur Bestimmung der Zugehörigkeit zu einer der drei Enzymgruppen im menschlichen Serum, welche Paraoxon (E 600) hydrolytisch spalten

Um Überschneidungen in den drei Aktivitätsgruppen der menschlichen Serum-Paraoxonase auszuschließen, wurden für die Prüfung einer Korrelation mit der Arylesteraseaktivität nur Seren verwendet, deren Paraoxonaseaktivitäten eindeutig einer der drei Paraoxonasegruppen zugeordnet werden konnten.

a) Angewandtes Meßverfahren

Die Serum-Paraoxonaseaktivität wurde nach der Methode von Krisch (1968) in einem selbstregistrierenden Spektralphotometer, Modell DK 2 der Firma Beckman Instruments, bestimmt.

b) Lösungen

E 600-Stammlösung: $1,2 \times 10^{-2}$ M E 600 in 0,1M Trispuffer, pH 8,0. Diese Stammlösung wird zum Gebrauch jeweils 1:5 mit dest. Wasser verdünnt.

Glycin-Natronlaugepuffer: 0,1M

Serum: 1:5 mit 0,9% Kochsalzlösung verdünnt.

c) Ansatz

In eine Küvette (Schichtdicke 1 cm) werden
pipettiert: 1,65 ml Puffer
 +0,25 ml 1:5 verd. Serum
 +0,50 ml E 600-Lösung.

d) Messung

In Abständen von 30 Sekunden wurde bei der Wellenlänge 405 nm die Extinktion der durch Hydrolyse freigesetzten Menge an p-Nitrophenol abgelesen. Ausgewertet wurde die Extinktionsdifferenz 180 sek. minus 30 sek. Vom Meßwert wurde der unter gleichen Bedingungen gemessene E 600-Leerwert (ohne Serum) abgezogen.

e) Berechnung

Zur Umrechnung der Extinktionsdifferenzen in Mol/l wurde der molare Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol zugrunde gelegt. Unter weiterer Berücksichtigung der Serumverdünnung und des Ansatzvolumens errechnete sich die Aktivität nach folgender Formel:

$$\text{Aktivität} = \frac{\Delta_E \times 10 \times 2,4 \times 20}{0,1805 \times 2,5} = \frac{\Delta_E \times 1063}{(U/l \text{ Serum})}$$

B. Methodik zur Messung der Serum-Arylesteraseaktivität mit β -Naphthylacetat als Substrat

a) Angewandtes Meßverfahren

Nach der Methode von Burlina und Galzigna

(1972) wurde die Aktivität der Serum-Aryl-esterase bestimmt.

b) Lösungen

DMSO (Dimethylsulfoxyd)-Stammlösung:

$2,68 \times 10^{-3} \text{ M}$ alkoholische
DMSO-Lösung wird zum Ge-
brauch jeweils 1:50 mit
0,05M Tris-HCl-Puffer
verdünnt.

c) Ansatz

In eine Küvette (Schichtdicke 1 cm) werden
pipettiert: 10 mg β -Naphthylacetat
 +50 μl Serum
 ad 2 ml verdünnter DMSO-
 Stammlösung.

d) Messung

Bei einer Temperatur von 25°C wurde die
Extinktion der durch Hydrolyse freigesetz-
ten Menge an β -Naphthol bestimmt. Die Ak-
tivität wurde bei einer Wellenlänge von 313
nm in Abständen von 30 Sekunden nach der
Enzymzugabe gemessen. Die Extinktionsdif-
ferenz (180 sek. minus 30 sek.) wurde wie-
der bestimmt und der β -Naphthylacetat-Leer-
wert (ohne Serum) vom Meßwert abgezogen.

e) Berechnung

Die Aktivität der Serum-Arylesterase wurde
unter Berücksichtigung der Serumverdünnung
und des Ansatzvolumens nach folgender For-
mel errechnet:

Aktivität = $E \times 9200$ (U/l Serum)

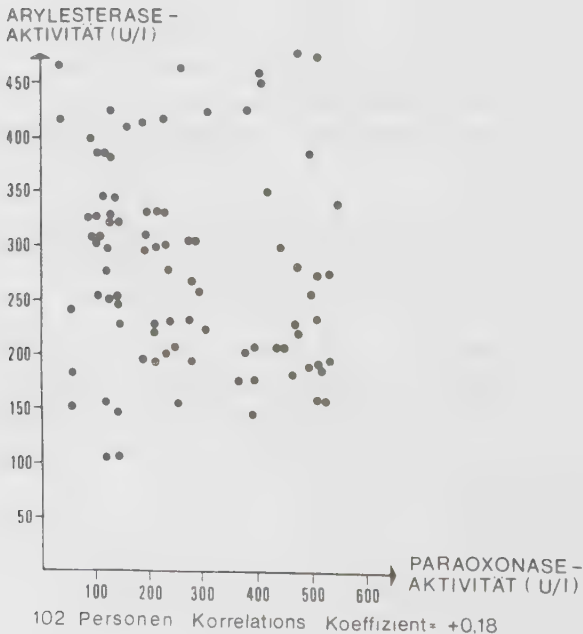
C. Versuchsergebnisse

Zur Untersuchung der möglichen Korrelation zwischen der Paraoxonaseaktivität und der Arylesteraseaktivität wurden bei 102 Seren von gesunden Erwachsenen vergleichend einmal die Paraoxonaseaktivitäten, sodann die Arylesteraseaktivitäten gemessen (Tab. 2 und Tab. 3).

Die Werte für die einzelnen Paraoxonaseaktivitäten und die dazugehörigen Arylesteraseaktivitäten sind in Abbildung 5 wiedergegeben. Auf der Abzisse lassen sich die Arylesterase-, auf der Ordinate die Paraoxonaseaktivitäten ablesen.

Abb. 5

Korrelation zwischen der Paraoxonase- und der Arylesteraseaktivität



Die Abbildung der Meßergebnisse, die bei der Untersuchung der Seren von 102 Erwachsenen ermittelt wurde, läßt keinen stochastischen Zusammenhang der Paraoxonase- und der Arylesteraseaktivität erkennen. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,18.

Tabelle 2

Paraoxonaseaktivität und Arylesteraseaktivität zur Bestimmung des Korrelationskoeffizienten

52 Personen

Name	Vorname	Paraoxonase- akt. (U/l)	Arylesterase- akt. (U/l)
Reiniger	Klaus	61,19	182,4
Kolest	Monika	63,79	245,5
Doles	Helmut	63,79	159,3
Stöber	Ingrid	111,64	306,4
Baumbach	Roland	112,08	385,5
Rösel	Ingrid	116,95	385,5
Vogel	Veronika	116,95	297,3
Kübert	Heidem.	118,40	142,7
Rösinger	Ingrid	119,23	340,5
Zinke	Regina	121,47	245,5
Mais	Christa	123,59	251,5
Rösel	Helga	127,23	385,5
Pleticha	Mirosl.	130,25	325,4
Iösch	Anita	130,25	113,5
Schwarz	Heinz	132,96	228,4
Schmitt	Babette	132,96	321,6
Schramm	Karin	133,36	186,3

Tabelle 2 Fortsetzung

Denk	Ingrid	223,27	416,2
Hunger	Rolf	223,27	548,6
Seltmann	Ingo	224,37	332,9
Baurmayer	Egon	224,37	297,3
Polster	Gudrun	225,47	416,3
Bauer	Regine	225,47	298,9
Seukler	Regina	236,28	548,6
Menzel	Hannel.	236,28	286,7
Rüppel	Anton	273,78	302,6
Lederer	Kurt	273,78	189,1
Denk	Claudia	297,76	257,2
Scharrn	Ursula	297,76	227,9
Denk	Christ.	304,18	257,2
Schwab	Doris	304,18	421,9
Popp	Sigurd	372,46	177,8
Graf	Uta	375,61	221,3
Münch	Karin	386,20	446,4
Kraus	Renate	390,61	228,9
Geisbauer	Gert	439,94	204,3
Scherer	Gernot	467,26	278,5
Lautner	Franz	470,09	221,2
Luber	Hans	472,56	498,3
Mond	Klaus	497,75	257,2
Ziegler	Rainer	497,75	181,9
Enz	Christa	504,97	189,1
Hauptle	Josef	505,28	514,5
Herold	Doris	509,23	234,5
Kramer	Gisela	509,23	158,9
Pickel	Hans	512,20	158,9
Gorlich	Helene	521,36	321,7
Ziegler	Anna	524,28	529,7

Tabelle 2 Fortsetzung

Stanz	Erwin	524,28	342,3
Rohr	Carmen	526,73	457,3
Schubert	Sonja	528,53	272,4
Polster	Irene	528,53	342,3

3. Untersuchungen zur Bestimmung des Einflusses von DFP (Diisopropylfluorophosphat) auf die Arylesteraseaktivität einerseits, und die Aktivität der menschlichen Paraoxonase andererseits

A. Methodik zur Messung des Einflusses von DFP auf die Arylesterase- und die Paraoxonaseaktivität

a) Angewandte Meßverfahren

Die Bestimmung der Arylesteraseaktivität gegen β -Naphthol wurde nach der oben beschriebenen Methode nach Burlina und Galzigna (1972) durchgeführt, die Werte für die Paraoxonaseaktivität wurden nach der Methode von Krisch (1968) ermittelt.

b) Durchführung der Hemmversuche

Das menschliche Serum wurde 20 Minuten mit DFP vorinkubiert.

DFP-Stammlösung: $1,4 \times 10^{-5} \text{M}$ DFP in 0,1M Trispuffer, pH 8,0, Inkubationszeit 20 min. bei 37°C Inkubationstemperatur.

Unter Berücksichtigung der Serumverdünnung und des Ansatzvolumens wurde nach den be-

kannten Formeln die Aktivität der Arylesterase, bzw. der Paraoxonase bestimmt.

B. Versuchsergebnisse

An 50 Seren wurde der Einfluß von DFP auf die β -Naphthylacetatspaltung durch die Arylesterase und die p-Nitrophenolfreisetzung durch die Paraoxonase bestimmt (Tabelle 3).

Die Hemmung der Aktivität wird in Prozent, bezogen auf die bei jedem Hemmansatz parallel mitbestimmte Normalspaltung (=100%) angegeben.

Man erkennt, daß die Arylesterase durch den Inhibitor in ihrer Aktivität um $24,8 \pm 8,2 \%$ gehemmt wird, wogegen die Paraoxonase einen Verlust von $12,7 \pm 4,6 \%$ zeigt.

Tabelle 3

Einfluß von DFP auf die Paraoxonaseaktivität und die Arylesteraseaktivität

50 Personen

Name	Vorname	Paraox.- akt. (U/l)	Paraox.- akt. (U/l) +DFP	Hemmung d. Paraox.- akt. durch DFP in %, d. Normalakt.	Arylest.- akt. (U/l)	Arylest.- akt. (U/l) +DFP	Hemmung d. Arylest.akt. durch DFP in %, d. Normal- aktivität
Fink	Norbert	62,4	54,8	12,2	416,2	207,6	28,5
Schilling	Emmi	67,3	55,1	18,2	461,6	370,8	19,7
Will	Gunther	91,7	77,8	15,2	325,4	276,2	15,2
Lehmann	Harry	95,6	83,1	13,2	306,1	238,3	22,3
Klement	Erwin	95,6	79,4	17,5	393,5	312,4	20,7
Krumholz	Horst	102,3	91,4	11,5	325,4	244,5	28,0
Kugler	Albrecht	103,6	88,7	14,6	302,7	219,9	27,4
Hulek	Friedm.	106,3	90,3	15,1	257,2	183,9	26,4
Stöber	Ingrid	111,6	99,6	10,8	332,9	208,1	27,5
Libalacker	Heinz	119,2	111,6	15,0	340,5	215,1	28,1
Rösinger	Ingrid	119,2	107,1	10,2	113,5	91,4	19,7
Huge	Karl-H.	121,4	108,3	10,3	158,9	121,9	23,3
Pitzmann	Richard	123,5	106,4	19,4	276,2	188,5	31,8

Tabelle 3 Fortsetzung

Ploticha	Virosl.	130,2	113,8	12,6	325,4	234,5	25,0
Hoh	Klaus	132,5	114,8	13,4	423,7	325,1	23,3
Schmitt	Habette	132,9	118,2	11,0	321,6	245,9	29,1
Maß	Angelika	132,9	116,6	10,1	251,5	178,5	27,7
Preuß	Wolfgang	132,9	118,1	11,2	385,5	205,8	27,6
Solmann	Ingo	224,3	208,3	7,2	332,9	205,1	34,1
Polster	Gudrun	225,4	205,2	7,9	416,2	322,1	22,7
Bauer	Kerine	225,4	198,4	12,0	208,9	230,2	23,0
Triedel	Werner	231,2	208,6	9,8	200,5	146,7	26,9
Dumler	Peter	236,2	218,4	7,7	276,2	231,2	15,3
Seukler	Regina	236,2	196,3	16,9	548,6	320,1	31,7
Hütte	John	238,4	207,0	13,2	223,2	159,3	27,7
Waurig	Siegmar	249,7	228,1	8,7	208,1	123,6	11,0
Prietz	Peter	253,4	238,8	5,8	158,5	111,2	22,9
Zimmer	Helene	262,4	238,3	9,2	461,6	279,8	12,7
Lederer	Kurt	273,7	234,1	14,5	120,1	142,9	3,5
Reppel	Anton	273,7	241,3	11,9	302,7	245,5	18,0
Hubes	Klaus	273,7	241,3	11,9	268,6	219,7	17,3
Grönd	Helmut	275,1	238,8	13,2	239,8	125,5	12,7
Schiffer	Joseph	275,6	246,2	10,6	220,5	146,7	26,9
Wist	Gjeter	322,5	231,1	13,4	423,7	325,1	23,3

Tabelle 3 Fortsetzung

Opitz	Ulrike	386,2	329,1	14,8	117,5	98,9	23,0
Marischler	Paul	390,6	352,6	9,8	211,8	144,3	31,0
Kraus	Renate	390,6	345,9	11,5	177,8	139,8	21,4
Müller	Klara	404,0	337,0	6,7	146,4	302,7	12,1
Gottschild	Roman	415,5	363,8	12,5	348,1	229,7	34,1
Seitz	Andreas	439,8	352,0	10,9	298,5	224,3	29,3
Geisbauer	Gerh.	439,8	387,6	11,0	204,3	164,7	19,4
Braun	Peter	462,4	418,7	9,5	181,6	130,7	28,1
Beer	Wolfg.	487,7	405,9	16,6	386,7	298,3	22,9
Linz	Christa	504,9	460,7	9,9	514,5	381,7	23,3
Hauptle	Joseph	505,2	455,3	9,2	189,1	142,3	24,3
Kramer	Gisela	509,2	467,3	8,3	185,9	127,3	18,9
Vogler	Norbert	512,2	428,1	16,5	518,3	171,8	18,7
Pickel	Hans	512,2	467,3	9,3	158,5	120,9	23,8
Zrenner	Peter	524,2	458,9	12,5	529,7	426,2	10,6
Beck	Gernot	528,5	481,3	9,0	272,4	224,3	17,7

IV Diskussion und Zusammenfassung

Bei der Suche nach Enzymen, die organische Phosphorsäureester durch Hydrolyse entgiften (Aldridge 1953, Augustinsson 1954, Erdöl und Boggs 1961, Hoskin 1967) wurde immer wieder die Auffassung vertreten, daß die Arylesterasen in der Lage seien, sowohl organische Phosphorsäureester als auch die Ester aromatischer Alkohole zu spalten (Aldridge 1953, Mounter und Whittaker 1953).

Auch findet sich in der gültigen Nomenklatur der Enzym-Kommission von 1972 der Name Paraoxonase als nicht empfohlene Bezeichnung für das Ferment EC 3.1.1.2, Arylesterase, Arylesterhydrolase. Ihre wesentliche Reaktion ist die Spaltung von Phenylacetat durch Wasser zu Phenol und Acetat. Bei den Bemerkungen zur Spezifität wird erwähnt, daß das Enzym aus Schafseren auch Paraoxon spaltet. Danach scheint das Enzym EC 3.1.1.2 also äußerst unspezifisch zu sein.

Bei der hier vorgelegten Arbeit wurden von 102 Seren gesunder Erwachsener vergleichend einmal die Paraoxonaseaktivitäten und die dazugehörenden Arylesteraseaktivitäten gemessen. Der gefundene Korrelationskoeffizient von 0,18 läßt keinen stochastischen Zusammenhang zwischen der Paraoxonase- und der Arylesterase erkennen, und spricht gegen eine Identität des als A-Esterase gekennzeichneten Enzyms (nach Aldridge) mit der E 600-spaltenden Esterase.

Als weiteres Kriterium zur Spezifizierung der Paraoxonase und Unterscheidung von der Arylesterase wur-

de der Einfluß von DFP auf die Arylesterase- und die Paraoxonaseaktivität bestimmt. Dabei zeigte sich, daß die Arylesterase durch Diisopropylfluorophosphat in ihrer Aktivität um $24,8 \pm 8,2$ % die Paraoxonase hingegen nur um $12,7 \pm 4,6$ % gehemmt wird.

Weiter konnten wir durch die Trennung von 67 Blutseren mit Hilfe der Stärkegelelektrophorese die Orte der Enzymaktivitäten von Paraoxon und Arylesterasen charakterisieren. Die Hauptaktivität des E 600-spaltenden Enzyms lag im β_2 -Globulin-Bereich, während die Hauptaktivität der Arylesterasen, die Phenylacetat und β -Naphthylacetat spalten, im Albuminbereich lagen.

Pilz (1962, 1962) fand im menschlichen Serum nach Stärkegelelektrophorese zwei verschiedene Arylesterasen, von denen eine mit dem Albumin wanderte, die zweite zwischen dem Albumin und der α_1 -Globulinfraktion.

Plomteux (1971) trennte menschliche Seren durch Agarose-Gel. Er fand drei Esterase-Aktivitäten, von denen eine Aktivität zwischen dem Praealbumin und dem Albumin, die zweite Fraktion mit dem α_1 -Globulin und die dritte Fraktion zwischen den α_2 - und den β_1 -Globulinen wanderte. Die von Wilde und Kekwick (1964) mit Zellolosesäulen getrennten drei Arylesterasen wanderten vor der Albumin- oder mit der Albuminfraktion. Keine der von den Autoren gefundene Arylesterase wanderte wie die von uns untersuchte Paraoxonaseaktivität mit den β_2 -Globulinen.

Nach den neuesten Untersuchungen stellt sich die menschliche Serum-Paraoxonase als ein sehr spezifisches Ferment dar (Geldmacher -v.Mallinckrodt und Mitarbeiter 1973), das noch in verschiedener Hinsicht einer näheren Charakterisierung bedarf. So müssen weitere Untersuchungen erst zeigen, ob die Aktivitätsunterschiede der drei Gruppen von Normalpersonen mit verschieden stark ausgeprägter Aktivität der Paraoxonase durch quantitative Unterschiede des gleichen Enzymproteins oder durch das Vorhandensein von drei qualitativ verschiedenen Enzymproteinen bedingt sind.

Bei unseren Untersuchungen konnten die drei Paraoxonase-Typen mit der Stärkegelelektrophorese nicht getrennt werden. Die Fraktionen für die drei photometrisch unterscheidbaren Paraoxonaseaktivitäten lagen alle im Bereich der β_2 -Globuline. Main (1960, 1960) konnte die Aktivität der Paraoxonase aus Schafserum 330-385fach anreichern. Die Präparation war, nach elektrophoretischen Untersuchungen, 85-90 % rein, und das Molekulargewicht wurde mit 35000-50000 angegeben. Dagegen steht die Isolierung der Paraoxonase aus menschlichem Serum noch aus.

V Literaturverzeichnis

1. ACKERMANN, H.:
Dünnschichtchromatographisch-enzymatischer Nachweis phosphororganischer Insektizide. Aktivierung schwacher Esterasehemmer.
J. Chromatog. 36, 309 (1968)
2. ALDRIDGE, W.N.:
Serum Esterases
1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate and a method for their determination.
Biochem. J. 53, 110 (1953)
3. ALDRIDGE, W.N.:
Serum Esterases
2. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera.
Biochem. J. 53, 117 (1953)
4. AUGUSTINSSON, K.B.:
The enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.
Biochim. biophys. Acta 13, 303 (1954)
5. AUGUSTINSSON, K.B.:
Electrophoresis studies on blood plasma esterases. I. Mammalian plasmata.
Acta Chem. scand. 13, 571 (1959)
6. AUGUSTINSSON, K.B. and HEIMBÜRGER, G.:
Enzymatic hydrolysis of organophosphorus compounds - IV. Specificity studies.
Acta chem. Scand. 8, 1533 (1954)

7. AUGUSTINSSON, K.B. and HEIMBÜRGER, G.:
Enzymatic hydrolysis of organophosphorus compounds - I. Occurrence of enzymes hydrolysing dimethyl-amido-etoxy-phosphoryl cyamide (Tabun).
Acta Chem. Scand. 8, 753 (1954)
8. BAITSCH, H. und LIEBRICH, K.G.:
Die Haptoglobintypen
Methodik ihrer Bestimmung, Allelen-Häufigkeiten in einigen Stichproben.
Blut 7, 27 (1961)
9. BURLINA, A. and GALZIGNA, L.:
A new and simple procedure for serum aryl-esterase.
Clin. Chim. Acta 39, 255 (1972)
10. ERDÖS, E.G. and BOGGS, L.E.:
Hydrolysis of paraoxon in mammalian blood.
Nature, Lond. 190, 716 (1961)
11. GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M., BAUMGARTNER, W., PETENYI, M., BURGIS, H., LINDORF, H.H. und METZNER, H.:
Korrelation zwischen der unterschiedlichen Vergiftbarkeit der Serum-Cholinesterase durch E 600 und der Aktivität des E 600-spaltenden Enzym-Systems in menschlichen Seren.
Z. Physiol. Chem. 353, 217 (1972)
12. GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M., LINDORF, H.H., PETENYI, M., FLÜGEL, M., FISCHER, Th. und HILLER, Th.:

- Genetisch determinierter Polymorphismus der menschlichen Serum-Paraoxonase (EC 3.1.1.2). Humangenetik 17, 331 (1973)
13. GELDMACHER-v. MALLINCKRODT, M., PETENYI, M., FLÜGEL, M., BURGIS, H., DIETZEL, B., METZNER, H., NIRSCHL, H. und RENNER, O.:
Zur Spezifität der menschlichen Serum-Paraoxonase.
2. Physiol. Chem. 354, 337 (1973)
14. HOSKIN, F.C.G. and ROSENBERG, P.:
Penetration of an organophosphorus compound into squid axon and its effects on metabolism and function.
Science 156, 966 (1967)
15. KRISCH, K.:
Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenylphosphat (E 600) durch menschliches Serum.
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 6, 41 (1968)
16. MAIN, A.R.:
The purification of the enzyme hydrolysing diethyl-p-nitrophenyl phosphate (Paraoxon) in sheep serum.
Biochem. J. 74, 10 (1960)
17. MAIN, A.R.:
The differentiation of the A-type esterases in sheep serum.
Biochem. J. 75, 188 (1960)
18. MOUNTER, L.A.:
Some studies of enzymatic effects of rabbit serum.
J. Biol. Chem. 209, 813 (1954)

19. MOUNTER, L.A. and WHITTAKER, V.P.:
The hydrolysis of esters of phenol by cholin-
esterases and other esterases.
Biochem. J. 54, 551 (1953)
20. PILZ, W.:
Untersuchungen über Fermente des menschlichen
Blutes, V.Definition und Methode zur Bestim-
mung der Arylesterasen des menschlichen Serums.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 328, 1 (1962)
21. PILZ, W.:
Untersuchungen über Fermente des menschlichen
Blutes, VI.Beitrag zur Kenntniss der Uneinheit-
lichkeit der Arylesterase I.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 328, 247 (1962)
22. PILZ, W.:
Präparative Stärkebreielektrophorese, VIII.Spez.
analytische Methode für die Biochemie und die
physiologische Chemie.
Z. analyt. Chem. 243, 587 (1968)
23. PLOMTEUX, G.:
Valeur Diagnostique Des Activités Estérasiques
Du Sérum Dans Les Affections Hépatiques.
Clin. Chim. Acta 32, 475 (1971)
24. SIMPSON, N.E.:
Serum arylesterase levels of activity in twins
and their parents.
Am. J. Hum. Genet. 23, 375 (1971)
25. SMITHIES, O.:
Zone electrophoresis in starch gels and its
application to studies of serum proteins.
Adv. in Prot. Chem. 14, 65 (1959)

26. WILDE, C.E. and KEKWICK, R.G.O.:
The arylesterases of human serum.
Biochem. J. 91, 297 (1964)
27. ZECH, R. and ZÜRCHER, K.:
Organophosphate splitting serum enzymes in
different mammals.
Comp. Biochem. Physiol. 48B, 427 (1974)
28. ZÜRCHER, K.:
Dissertation Göttingen (1971)

Herrn Professor Dr. H. B. Wuermeling sage ich meinen aufrichtigen Dank für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut und die Übernahme des Korreferates.

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt für die Überlassung des Themas, ihr freundliches Entgegenkommen und die überaus große Hilfsbereitschaft.

Herrn O. Opitz bin ich sehr verbunden für seine Hilfe bei der Anfertigung der Abbildungen,

sowie Herrn Dr. Lorke, Leiter des Institutes für Toxikologie der Fa. Bayer AG, für die Überlassung von reinem E 600.

L e b e n s l a u f

Personalien: Jürgen
 Franz/Großhauser geb. 15.1.1947
 in Neumarkt/Opf.

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

Eltern: Franz Großhauser,
 Bauingenieur
 Frieda Großhauser,
 geb. Blümke

Ausbildung: Volksschule: 1953-1957
 in Berching/Opf. und
 Nürnberg

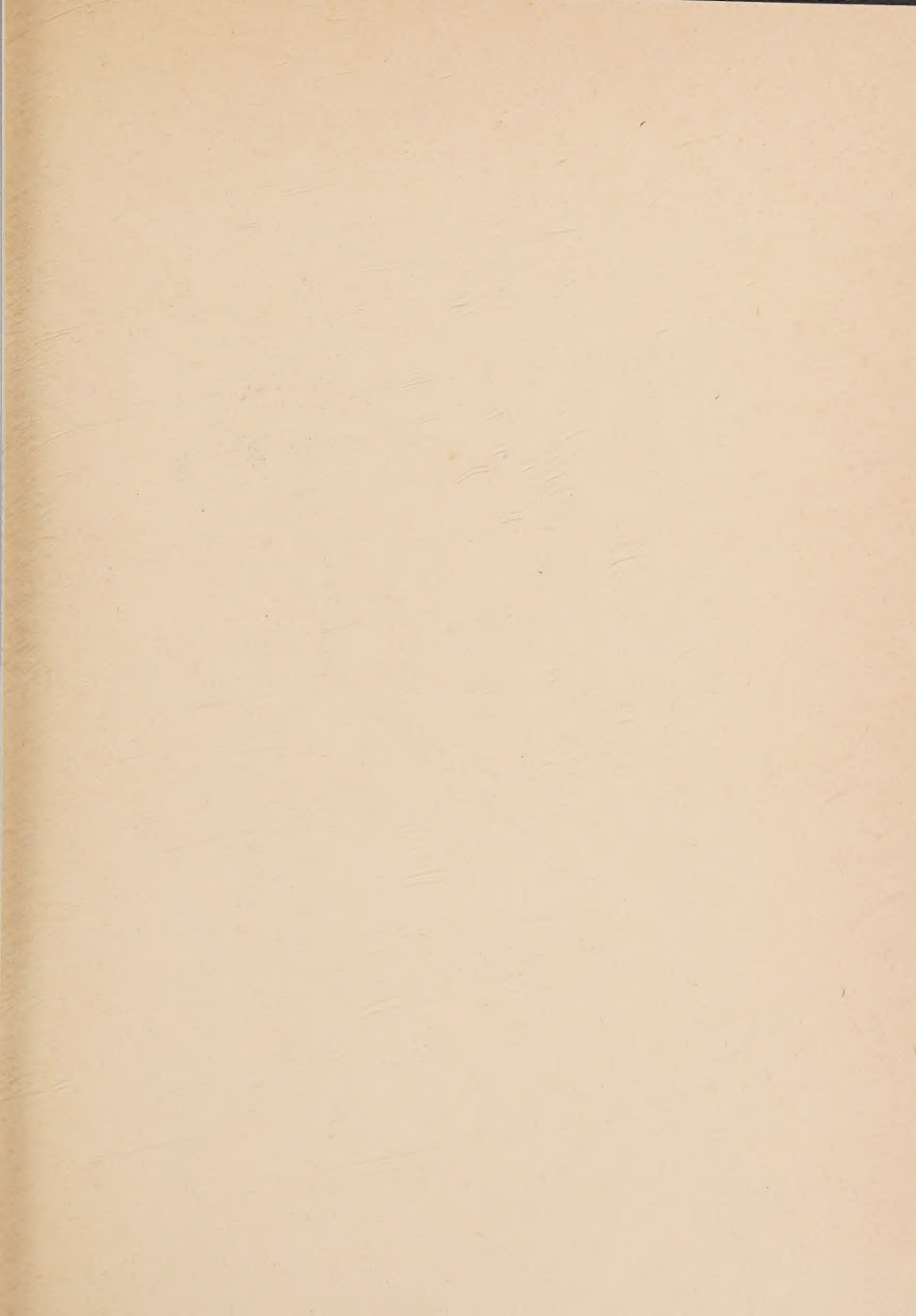
 Höhere Schule: 1957-1966
 Hum. Gymnasium in
 Bamberg und Nürnberg
 Abitur 1966 in Nürnberg

 Universität: in Erlangen Studium
 Chemie/Biologie
 in Würzburg und
 Erlangen Medizin

 Prüfungen: Vorphysikum in
 Würzburg 1970
 Physikum in
 Erlangen 1972
 Staatsexamen Chemie/
 Biologie in Erlangen 1972
 Staatsexamen Medizin
 in Erlangen 1975

Erlangen, im Oktober 1976

Franz Jürgen Großhauser



Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197